Studie zu einem stagoskopartigen Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion

---

von

Theo Ott

aus Würzburg

1964

1964 № 22

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538102_0062

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof.Dr.med.et Dr.phil.E.Weinig

Studie zu einem stagoskopartigen Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von Theo Ott aus Würzburg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg.

Dekan: Prof.Dr.med. G. Theissing
Referent: Prof.Dr.med.et Dr.phil.E.Weinig
Tag der mündlichen Prüfung: 25.5.1964

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
I. Einleitung	1
II. Überblick und Methoden zur Feststellung der Antigen-Antikörper-Reaktion	1
1.) Die HAUSER'sche Kapillarmethode	6
2.) Die (OUDIN-)OUCHTERLONY'sche Agargeldiffusion	6
3.) Die Antigen-Antikörper-Praecipitation unter dem Mikroskop	8
4.) Das fluoreszenzimmunologische Verfahren	9
III. Eigene Untersuchungen	11
IV. Diskussion	19
V. Zusammenfassung	24
VI. Literaturverzeichnis	25

I. Einleitung.

In der Studie zu einem stagoskopartigen Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion werden nach einem Überblick hinsichtlich Begriff und Wesen der Reaktionspartner, bekannte Methoden zur Feststellung der Antigen-Antikörper-Reaktion beschrieben. Abschliessend wird über eigene Untersuchungen berichtet, die sich vorzüglich auf stagoskopische Erkenntnisse gründen.

II. Überblick und Methoden zur Feststellung der Antigen-Antikörper-Reaktion.

Den Begriff Antigen und Antikörper umreißt die prägnante Erklärung von R.DOERR: "Das Antigen wird durch die Beziehungen zu den Antikörpern, wie umgekehrt der Antikörper durch die genetischen und reaktiven Verhältnisse zu dem Antigen bestimmt". Wenn man also eine Aussage über das Wesen der Antigene machen will, so heißt dies, daß man es zugleich im Spiegel der zugehörigen Antikörper erfassen und darstellen muß.

Bei einer Wertung der bisherigen Forschungsergebnisse, insbesondere bezüglich der serologischen Spezifität, sind die Einführung von chemisch modifizierten Antigenen im Sinne immunchemischer Determinanten als der herausragende Gipfel zu bezeichnen, wenn auch, selbst von dieser Höhe aus, die erhoffte volle Einsicht in das vorliegende wissenschaftliche Gebiet noch nicht erreicht wurde. Denn die Hoffnung, mit der Feststellung des Einflusses von chemisch bekannten Antigenstrukturen auf die Spezifität des Antikörpers die endgültige Lösung des Gesamtproblems gefunden zu haben, erfüllte sich nur zum Teil. Bei der Gewinnung eines vollwertigen, das heißt spezifischen Antikörpers, muß auch in Zukunft bedacht werden, daß, da es eben in ihrer Dynamik verschiedene Determinanten des Antigenmoleküls gibt, die Spezifität des Antikörpers durch die Dauer und Intensität des Immunisierungsprozesses beeinflußt wird, diese also ab-, bzw. die Reaktionsbreite zunehmen kann. R.DOERR hat diese Gegebenheit folgendermaßen formuliert: "Das chemisch einheitliche Antigen enthält dominierende und

minder aktive Determinanten; es werden zuerst Antikörper gegen die dominante Gruppe gebildet und später zusätzlich Antikörper gegen die Determinanten von geringerer Aktivität".

Das Wesen des Antikörpers definieren W.C.TOPLEY und G.S. WILSON: "Antikörper ist jede Substanz, welche im Blutserum oder in den Körpersäften eines Tieres als Antwort auf den Reiz hin erfolgt, den die parenteraleEinführung eines Antigens, als artfremdes Substrat, in die Gewebe ausübt und die mit diesem Antigen spezifisch in irgend einer der Beobachtung zugänglichen Art reagiert." Nicht zu vergessen ist, daß diesen Immunantikörpern die sogenannten natürlichen Antikörper anzugliedern sind. Es handelt sich hierbei um Antikörper, deren genetische Beziehung zu einem Antigen nicht offenkundig ist, wobei jedoch keineswegs präjudiziert werden darf, daß zwischen diesen und den Immunantikörpern eine Kluft besteht, welche etwa zur Trennung nötigt. In gleichem Sinn äußert sich auch R.DOERR in seiner Abhandlung über "Die natürlichen Antikörper." Hinsichtlich des Ursprungs der Antikörper gilt heute die auf PAUL EHRLICH zurückgehende und z.B. von W.C.C.TOPLEY und G.S.WILSON übernommene Vorstellung, daß die Antikörper in den Zellen praeformiert, mithin normale Produkte des Zellstoffwechsels seien, nicht mehr. Wie K.LANDSTEINER, J.R.MARRACK, P.R.CANNON, so neigen fast alle führenden Forscher der Gegenwart der Ansicht zu, daß die Antikörper Serumglobuline sind. Doch bleibt die Frage offen, wie man sich bei dem Phaenomen der "erblichen Anaphylaxie" die Passage eines Serumglobulins, also eines hochmolekularen Proteins, bei der relativen Impermeabilität der Placenta vorstellen soll. Auch die Persistenz der Antikörper, die voraussetzt, daß die Antikörperproduktion, wenn sie einmal durch den Antigenreiz in Gang gesetzt wurde, gleichsam autonom wird und ihr Ende erst in Folge von Bedingungen erreicht, welche nicht mehr im Reiz, sondern nurmehr in den gereizten Zellen gesucht werden müssen, läßt sich damit nicht erklären. Neben weiteren der Globulinnatur der Antikörper entgegenstehenden Tatsachen, ist besonders auf die an die Gewebe gebundenen Antikörper hinzuweisen. Daß man Organe blutfrei spülen kann

und daß sie auch dann noch auf ein Antigen reagieren, läßt wohl kaum annehmen, daß der Antikörper in Form eines nicht auswaschbaren Globulinfilms anwesend ist. Gerade die Tatsache dieser sessilen, d.h. an das Gewebe gebundenen Antikörper, weist aber teilweise wieder auf die zelluläre Erstansicht zurück. So zeigt die Bilanz der bisherigen experimentellen Ergebnisse, daß wir über den Ort der Antikörperbildung, über den Mechanismus dieses Vorganges, über die endgültige Natur der Antikörper und ihre unbegrenzte Variabilität noch keine eindeutigen Kenntnisse besitzen (R.DOERR).

Die Antigen-Antikörper-Reaktion in Form der Praecipitation ist seit C.von DUNGERN bereits 1903 auf die in ihr liegenden Möglichkeiten hingewiesen hatte, bis heute das bevorzugte Objekt serologischer Untersuchungen geblieben, weil sie eben der direkten Beobachtung zugänglich ist. Ein geschichtlicher Rückblick zeigt, daß R.KRAUS es war, der 1897 feststellte, daß Immunsera inkeimfreien Filtraten von Bakterienkulturen Niederschläge erzeugen. Voraussetzung für die stattgehabte Praecipitation war die Zusetzung eines homologen Immunserums zum Kulturfiltrat. R.KRAUS schloß daraus, daß die Praecipitation als ein Immunitätsphaenomen sui generis zu betrachten sei und nannte deren Antikörper - neben den bekannten wie Antitoxine, Bakteriolysine und Agglutinene - wegen ihrer Wirkungsweise Praecipitine. Die Ausweitung dieser Erkenntnis nahm J.BORDET vor, indem er sich die Frage stellte, ob man nicht durch Injektion von tierischen Zellen den gleichen Erfolg erzielen könne, wie durch Injektion von Bakterien, unter der selbstverständlichen Voraussetzung, daß diese ebenso körperfremd sind, wie dies bei pathogenen Mikroben naturgemäß der Fall ist. Bereits 1899 konnte J.BORDET mit seinen Untersuchungen den entscheidenden Schritt tun und feststellen, daß man auch durch die Behandlung mit gelösten Proteinen tierischer Herkunft Antikörper erzeugen kann, welche mit dem verwendeten Antigen unter Niederschlagsbildung spezifisch reagieren.

Wenn auch mit der Bezeichnung Praecipitation und Prae-

cipitine, Agglutination und Agglutinine, Giftneutralisierung und Antitoxine das Sinnfällige herausgestellt und mit Namen belegt wird, so ist doch an die innere Einheit des Geschehens zu denken. Es hat unter den Forschern immer "Unitarier" gegeben, ja Le DANTEC z.B. hat sogar über die Vielheit der Bezeichnungen gespottet und die Begriffswelt der Immunologen als das Reich der Phaenomenine bezeichnet. Doch bestehen, wie Untersuchungen von E.P.PICK und O.BAIL ergaben, z.B. bezüglich der Bakterienkulturfiltrate nicht von der Hand zu weisende Anzeichen dafür, daß, wie auch R. KRAUS und C. von PIRQUET es ausdrückten, außer spezifisch agglutinierbaren auch noch spezifisch praecipitierbare Substanzen enthalten sind.

Bei der gemeinsamen Reaktion von Antigen und Antikörper tritt nun die Frage auf, in welchem Ausmaß sich diese jeweils daran beteiligen. Setzt man entweder das Antigen oder das antikörperhaltige Immunserum in fallenden Mengen zu und beobachtet weiter, ob eine Verminderung des Antigens oder eine Reduzierung des Immunserums möglich ist ohne die Entstehung eines Niederschlages zu drücken, so bietet sich damit als einfache Lösung der Frage die Tatsache an, daß diejenige Komponente, welche nicht bzw. nur in geringem Grade herabgesetzt werden kann, an den Flockungsgebilden vorwiegend beteiligt sein muß. Vergleicht man demnach die Agglutination mit der Praecipitation, so wird man folgenden Regelsatz aufstellen können: Die Flockungsprodukte bei der Agglutination setzen sich in der Hauptsache aus den Zellen, also aus dem Antigen, die bei der Praecipitation aus den Immunproteinen der Antisera, also aus dem Antikörper zusammen.

Die innere Bindung von Antigen und Antikörpermolekülen im Flockungsprodukt führten zu einer bis heute unlösbaren Streitfrage. Hierbei geht es darum, ob man den Antikörpern eine Monovalenz oder Polyvalenz zusprechen dürfe. F.HAUROVITZ hat stets die Auffassung verteidigt, daß die Antikörper monovalent sind. Im Gegensatz zu ihm vertreten aber zahlreiche Autoren wie M.HEIDELBERGER, F.E.KENDALL, E.A.KABAT, J.MARRACK,

L.PAULI, A.TYLER den Standpunkt, daß die Antikörper multivalent sind, wenn auch nicht gerade in demselben Umfang wie die zugehörigen Antigene. In diesem Zusammenhang muß an die sogenannte Gittertheorie gedacht werden, die im Falle ihrer Richtigkeit den Vorteil bieten würde, das Anwachsen der zuerst unsichtbaren Antigen-Antikörperkomplexe zu sichtbar werdenden Aggregaten unschwer verständlich zu machen. Es wird bei dieser Theorie angenommen, daß die Flockung aus einem Antigen-Antikörpergitter oder Netzwerk besteht. Dies würde natürlich voraussetzen, daß sowohl die Antigenmoleküle als auch die Antikörpermoleküle bis zu einem gewissen Grad multivalent sind. Die Lösung dieses offenen Problems brachte auch nicht das Elektronenmikroskop, obwohl man einer solchen näher kam. Neben diesem Wachsen der primären Antigen-Antikörperkomplexe interessierte auch deren auffallende Verfestigung. Die Untersuchungen und Beobachtungen lassen erkennen, daß man wohl über die bloße Verbindung von Antigen und Antikörper hinausgehende aber noch nicht voll faßbare Kräfte annehmenmuß. Weiter wird diese Feststellung dadurch untermauert, daß z.B. die Zellen der Agglutinate nicht nur untereinander eng verbunden sind, sondern daß sie an der Glaswand der Eprouvetten oft so fest haften, daß sie geradezu abgeschabt werden müssen. Im Zusammenhang mit diesen Beobachtungen sind die Namen S.B.HOOCKER, W.C.BOYD, K.LANDSTEINER, S.RAFFEL u.a. zu nennen.

Hier darf aus eigener Beobachtung angefügt werden, daß auch das Praecipitat eine gewisse, wahrscheinlich auf Molekülgröße beruhende, Haftfähigkeit auf dem Objektträger zeigt. Diese Tatsache kann, wie unten näher ausgeführt wird, für den optischen Nachweis eines spezifischen Praecipitats mitgenützt werden.

In Forschung und Praxis sind - neben anderen - folgende auf Antigen-Antikörperreaktion beruhende und von uns ausgewählte Testmethoden bekannt:

1.) Die HAUSER'sche Kapillarmethode als verfeinertes UHLENHUTH'sches Originalverfahren.
2.) Die (OUDIN-) OUCHTERLONY'sche Agargeldiffusion.

3.) Die Beobachtung der Antigen-Antikörper-Praecipitation unter dem Mikroskop.

4.) Das Fluoreszenzverfahren in Form der Markierung von Proteinen mit fluoreszierenden Farbstoffen.

Unsere eigenen Untersuchungen, die mit obigen Methoden in gewissem Zusammenhang stehen, ein Umstand welcher auch deren Auswahl mitbestimmte, mögen angefügt sein.

1.) Die HAUSER'sche Kapillarmethode.

Diese Methode bildet eine überaus glückliche Ergänzung der auf WASSERMANN-SCHÜTZE und letztlich auf UHLENHUTH zurückgehenden biologischen Röhrchenprüfung. Obwohl sie die gleiche Verläßlichkeit wie diese zeigt, stellt sie darüberhinaus ein verfeinertes serodiagnostisches Verfahren dar. Nach Herstellung einer Konzentration von 1:1000 des fraglichen Eiweißes bringt man einen großen Tropfen des letzteren sowie einen solchen des Antiserums auf je einen Hohlobjektträger. Durch Kapillarattraktion gelingt bei Schräghalten der Kapillare die Aufnahme eines Teiles des jeweiligen Tropfens, wobei man der Untersuchungsflüssigkeit das Antiserum, unterschichtend, nachlaufen läßt. Das Ausfließen der Flüssigkeit wird durch Verschluß der oberen Öffnung der Kapillare mittels des Zeigefingers und in der Folge durch Verkleben der unteren Öffnung mit Plastilin erreicht. Bei aufrechter Stellung des Haarröhrchens zeigt sich in der Berührungszone beider Flüssigkeiten alsbald ein weißlicher Praecipitatring, der sich in der Folge verbreitert und schließlich nach längerem Stehen in kleinen Flöckchen absenkt - sofern das Antiserum homologes Eiweiß im Antigen gefunden hatte.

Als Vollendung der klassischen UHLENHUTH-schen Methodik und als vielfach angewandte Technik verdiente sie Ersterwähnung.

2.) Die (OUDIN-)OUCHTERLONY'sche Agargeldiffusion.

Im Verhältnis zu dem vorgenannten Verfahren stellt die (OUDIN-)OUCHTERLONY'sche Agargeldiffusion eine weitere Verbesserung dar. Ihr wesentlicher Vorzug liegt darin, daß man

auch trübes Untersuchungsmaterial auf der selben Agarplatte und damit unter gleichen Bedingungen gegen verschiedene Immunseren testen kann, wobei neben einer guten Ablesbarkeit die Möglichkeit der Fixierung und Aufbewahrung des Untersuchungsergebnisses zu Dokumentationszwecken gegeben ist. OUCHTERLONY selbst verwendet zur Gelherstellung 15 g Difco Bacto Agar, den er zusammen mit einem Liter destilliertem Wasser 4 - 6 Stunden quellen läßt, anschließend 1oo g Na-Merthiolat zur Niederhaltung der Bakterienentwicklung beifügt und das Gemisch im kochenden Wasserbad solange erwärmt, bis der Agar klar und homogen geworden ist und die Übertragung auf eine ca. 8,5 x 1o cm große Glasplatte bzw. in eine Petrischale zuläßt. Nach Erstarren des Agars werden aus dem Gel mit Hilfe eines Zylinders neben einem Mittelloch im Durchmesser von 5 mm, 4 weitere in einer Entfernung von 1o mm bei gleichem Abstand voneinander, ausgestanzt. In das zentrale Loch wird, wie erwähnt, das zu testende Material, in die umliegenden Löcher verschiedene Antiseren gefüllt. Die Reaktion selbst läuft innerhalb von 24 Stunden in einer feuchten Kammer ab, wobei der Grad der Aufstellungstemperatur (von $+2^{\circ}$ bis 37°) einen gewissen Einfluß auf die Diffusionsgeschwindigkeit hat. Während des Reaktionsvorganges muß, um deren Gleichmäßigkeit zu garantieren, eine konstante Temperatur beibehalten werden. Die Praxis hat ergeben, daß eine bei tieferer Temperatur und somit langsamerer Diffusion vor sich gehende Reaktion hinsichtlich der zwischen den Löchern entstehenden Praecipitationslinien schärfere Bilder ergibt. Sollte sich nach 24 Stunden eine verhältnismäßig schwache Linienzeichnung ergeben, so ist ein Nachlaufenlassen von Antiserum oder Antigen, das zu einer zweiten parallel zur ersten verlaufenden und ebenfalls schwachen Reaktionslinie führen würde, nicht zu empfehlen. Die Weiterentwicklung dieser Technik zielte in der Hauptsache darauf ab, Material zu sparen und führte zu einer von HARTMANN und TOILLIEZ entwickelten sogenannten Mikromethode mit einem Lochdurchmesser von nur 1,6 mm. W.MARESCH beschritt in der Folge einen Mittelweg zwischen der Erstmethode von (OUDIN-)

OUCHTERLONY und der Mikromethode von HARTMANN und TOILLIEZ, indem er den Lochdurchmesser wieder auf 3 mm erweiterte und die Reaktionstemperatur mit 18° C festsetzte. Dieses modifizierte Verfahren findet heute in der Praxis bevorzugt Anwendung.

Als neues Moment taucht also hier zum ersten Mal die Fixierung des Befundes mit der Möglichkeit ihn für Dokumentationszwecke bereit zu halten, auf. Unsere Nachweistechnik, die diesen Vorzug ebenfalls aufweist, erschöpft aber auch die Möglichkeit des Verfolgens der Antigen-Antikörper-Praecipitation unter dem Mikroskop. Die Beobachtung der Praecipitation, vorzüglich im hängenden Tropfen, welcher sich Forscher wie ROBIN, GRÜNBAUM, TCHISTOVITSCH, TARCHETTI, MODICA und BIONDI schon frühzeitig bedienten und absolut günstig beurteilten, soll deshalb anschließend kurz dargestellt werden.

3.) Die Antigen-Antikörper-Praecipitation unter dem Mikroskop.

Bei dieser Beobachtungsart wird von einem Eiweißsubstrat bzw. einem filtrierten Blutfleckenextrakt mittels einer Kapillare ein Tropfen auf ein gut gereinigtes Deckgläschen gebracht, im Mengenverhältnis 2:1 Antiserum zugefügt und, vielfach im hängenden Tropfen, bei starker Vergrößerung mikroskopiert. Hierbei zeigt sich nach kurzer Zeit ein feinkörniger Niederschlag, der sich, bei entsprechender Stärke der Reaktion, zu Flocken-Plaques verbindet und fortlaufend an Dichte und Menge zunimmt. Für eine einwandfreie Klärung des Befundes sind Kontrollproben mit heterologem Blut und Kochsalzlösung nicht zu entbehren und in der selben Weise auszuführen. Bewertend ist zu sagen, daß, ebenso wie mit der Kapillarmethode, auch mit diesem Verfahren ein quantitatives Arbeiten unmöglich ist.

Die bisher beschriebenen Testmethoden beruhten ausschließlich auf Makroreaktionen und waren damit insofern nur indirekte Nachweise, als sie nicht die ursprüngliche Bindung zwischen Antigen und Antikörper, sondern eine biologische, biochemische oder biophysikalische Folge der Antigen-Antikörperbindung, nämlich eine Flockung nachwiesen. Eine Bestimmung des Ortes der Antikörperbindung oder -bildung bis hinab zu einer Größen-

ordnung, die dem Auflösungsvermögen des Lichtmikroskopes entspricht, gelang erst durch die elegante Nachweismethode, die vor allem M.HAITINGER weiter ausbaute und deren Grundtatsachen in dem folgenden Abschnitt über Fluoreszenzimmunologie Erwähnung finden sollen.

4.) Das fluoreszenzimmunologische Verfahren.

Es war die geniale Idee der amerikanischen Forscher A.H. COONS und M.H.KAPLAN Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen zu markieren. Dieser von ihnen 1942 verwirklichte Gedanke brachte eine Ausweitung der Forschungsmöglichkeiten ähnlich der durch die Erfindung des Mikroskopes. Freilich waren schon Versuche vorausgegangen die Bindung des Antikörpers direkt nachzuweisen, indem man das Antikörperprotein auf andere Art kennzeichnete. Dies geschah dadurch, daß man über eine Diazoverbindung das Protein anfärbte oder eine Markierung mittels eines radioaktiven Isotops versuchte. Ist die Kennzeichnung mit Diazofarbstoffen für den mikroskopischen Bereich nicht farbkräftig genug, so erfordert die radioaktive Markierung einen relativ umständlichen Nachweis, verbunden mit einer kostspieligen Laboreinrichtung. Zur Fluoreszenz selbst sei folgendes erklärend gebracht: Das Wesen der Fluoreszenz besteht darin, daß ein Stoff, der von einem kurzwelligen Erregerlicht angestrahlt wird, ein langwelligeres und deshalb andersfarbiges Licht emittiert. Hierbei kann es allerdings, was nicht übersehen werden darf, durch Energieabsorption zu einer Ausbleichung des Fluoreszenzfarbstoffes kommen und damit der Erfolg zunichte gemacht werden. Der technische Vorgang bei dem Verfahren ist dieser: Vor allem bedarf es eines Serums mit hohem Antikörpertiter, an welches z.B. das Fluoreszeinisozyanat oder besser das einfacher herzustellende Fluoreszeinisothiozyanat, sowie andere einwandfrei gebunden werden. Nach Reinigung des Reaktionsgemisches von nicht gebundenem Farbstoff, steht ein Antikörper zur Verfügung, der im ultravioletten oder kurzwelligen sichtbaren Licht fluoresziert. Läßt man nun die Lösung dieses Fluoreszein-Antikörperkonjugates auf ein homologes

Antigen einwirken, so kommt es infolge einer spezifischen Reaktion zur nicht auswaschbaren Bindung. Allerdings lassen sich unspezifische Bindungen nicht ganz ausschalten. Unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchten demzufolge, aber nur im Idealfall, allein diejenigen Stellen des Präparates, wo der Antikörper gebunden ist, deutlich auf, während die übrigen teils unsichtbar bleiben, teils eine andersfarbige Autofluoreszenz aufweisen. Neben diesem üblichen Ansatz des homologen Antigens mit seinem markierten Antikörper, interessiert auch die sogenannte SANDWICH-Methode. Zu letzterer folgende Erklärung: Alle Antikörper sind Proteine und damit zugleich Antigene; allerdings nur in einem artfremden Individuum. Ein Antikörper, der durch Immunisierung eines Kaninchens gewonnen wurde, ist für ein Schaf ein Antigen, nicht aber für das Kaninchen selbst. Ein Kaninchen-Gamma-Globulin einem Schaf eingespritzt, bewirkt demnach als Antigen einen "Anti-Antikörper", mit dem die Bindung eines nicht markierten spezifischen Antikörpers nachträglich bewiesen werden kann. Weiß man also, daß der zum Ansatz gekommene Antikörper z.B. vom Kaninchen stammt, so können wir ihn durch markierten Anti-Kaninchen-Globulin-Antikörper schließlich noch färberisch nachweisen. Mit der direkten Methode lassen sich natürlich auch Antigene, sofern es sich um Proteine handelt, markieren und dienen dann z.B. der Feststellung, wo Antikörper im Verlaufe einer Immunisierung gebildet werden. Über die färberische Möglichkeit mit fluoreszierenden Stoffen, wie dem Akridinorange, hinausgehend, gewann die fluoreszenzimmunologische Technik insofern ein weiteres Anwendungsfeld, als man durch sie auch nur wenige lebende oder tote Mikroorganismen eindeutig erkennen kann. Denn die allermeisten Mikroorganismen besitzen spezifische Antigene, sodaß mittels des entsprechenden Antikörpers in kürzester Zeit die Diagnose gestellt wird. Zusammenfassend darf gesagt werden, daß Forscher wie FISKE-NOYES, MELLORS, GOLDMAN, GITTLIN, LANDING, WHIPPLE und viele andere dieses Fluorochromierungsverfahren in zahlreichen Versuchen angewandt und abgewandelt haben. Die Zielsetzung der Fluoreszenzmikroskopie ist und bleibt also, einen

im chemischen Sinne spezifischen fluoreszierenden Farbstoff zur Verfügung zu haben, der mit einem genau definierten Substrat reagiert und diesem Leuchtkraft verleiht. Wie festgestellt, ist dies bisher allein durch Antigen -Antikörpermarkierung und der damit in Zusammenhang stehenden biologischen Reaktionen möglich. Auf Grund ihrer diffizilen Beschaffenheit hat die Fluoreszenzimmunologie noch zu keiner Routinemethode geführt; ihre Weiterentwicklung ist unbestritten wenigen erfahrenen Spezialisten vorbehalten.

Im Zusammenhang mit der nun zu behandelnden eigenen Nachweistechnik mag aber trotzdem der Hinweis erlaubt sein, daß es, da ein an den Antikörper gebundener fluoreszierender Farbstoff als Protein-Farbe gleichzeitig ein Kolloid ist, theoretisch möglich sein müßte, ihn zur evtl. noch spezielleren Darstellung des im "Kolloidfenster" (s.u.) sichtbaren Praecipitationsbildes zu verwenden.

III. Eigene Untersuchungen.

Die eigene Nachweistechnik im Rahmen der vorliegenden Studie beruht zwar auf den althergebrachten Makroreaktionen und damit dem indirekten Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion, ist aber gleichzeitig verwandt mit dem modernen Analysenweg der Stagoskopie und den daraus gewonnenen Erkenntnissen. Die Miterwähnung des Wesentlichen dieses Wissenszweiges dient am besten dem Verständnis der Zusammenhänge.

ALFONS SOLÉ beschäftigte sich mit der Stagoskopie, was so viel wie Tropfenschau und mit ihrem Ergebnis dem Stagogramm, was so viel wie Tropfenbild bedeutet und prägte auch diese Bezeichnungen. Vorgänger auf dem Gebiet waren DOLD, HENNING und ZENKER. Es geht dabei um die Beobachtung und Beschreibung von Tropfen, um deren unter bestimmten Bedingungen ablaufende Verdunstung sowie den Übergang in den Endzustand nach vollkommener Verdunstung. Als Ergebnis zeigt sich im Stagogramm eine Bild gewordene Beeinflussung der Kristallisation des in der Lösung enthaltenen Kochsalzes durch die als Lösungs-

genossen vorhandenen kolloiden Substanzen. Konnte man also bisher Säfte nur chemisch analysieren und physikalisch charakterisieren, so ist es nun möglich ihre Morphe zu beschreiben. In den typischen Stagogrammen der Säfte, wie des Blutserums, können nämlich Auftrocknungsbilder erhalten werden, die einer morphologischen Bestimmung durchaus ebenbürtig sind. Physikalisch gesehen, stellt jedes Stagogramm grundsätzlich einen dem Objektträger aufsitzenden angetrockneten Tropfen dar. Begünstigend für die Anwendung der Stagoskopie auf medizinischem Gebiet ist die Tatsache, daß das Kochsalz in den normalen wie in den veränderten Säften das dominierende Salz ausmacht und in seiner Kristalltracht durch das jeweilige organische bzw. anorganische Milieu zu charakteristischer Stagogrammbildung veranlaßt wird. In der Hauptsache sind es Kolloide, die als Lösungsgenossen in der Vielfalt der Tracht des Kochsalzes ihren Ausdruck finden und, wie in Vorliegendem, ein jeweils besonderes Stagogramm formen. Wir lassen nämlich stets der eigentlichen Nachweisreaktion die stagoskopische Probe der Reaktionspartner vorausgehen und fertigen zunächst ein Stagogramm des Antiserums und dann ein solches seines Serums, wobei wir dessen Eiweißkonzentration, die 1:1000 betragen soll, durch das Kolloidbild annähernd beurteilen können. Bringen wir weiter die beiden an sich qualitativ und quantitativ verschiedenen Eiweißlösungen vereint zum Ansatz, so sehen wir im Zuge der Entwicklung dieses Stagogramms unter dem Mikroskop folgendes: Mit fortschreitender Auftrocknung hellt sich die zuerst dunklere Peripherie auf und gleicht sich dem heller aufleuchtenden Zentrum an. In der Folge entstehen randständige konzentrische Ringe und mit deren Auftreten eine langsam einsetzende allgemeine Differenzierung. Es erscheinen muschel- bzw. spießförmige Zeichnungen, welche häufig mit sogenannten Pfötchen, das sind kommaförmige Gebilde, die Entwicklung gegen die Peripherie zu abschließen. Die Peripherie selbst wird von einem kompakten Eiweißrand gebildet, der sich als solcher mittels der Ninnyarinprobe nachweisen ließe. Das Zentrum dagegen zeigt nur zarte Beete, die einer dünnen Eiweißplatte aufsitzen

und zum großen Teil aus Kochsalz bestehen.

Die Breite des gebildeten peripheren Eiweißgürtels verhält sich proportional zum Eiweißgehalt des Serums, wobei die bevorzugte Ansammlung am Rande des Stagogramms keineswegs eine Besonderheit des Eiweißes darstellt, sondern diese Verhaltensweise allen Kolloiden eigen ist. Eine Kolloidlösung zeigt auch während des Verdunstungsvorganges keine Retraktion des Tropfenrandes, sondern im Gegenteil eine Dickenzunahme, die zum Randwall führt. Es findet demnach während der Verdunstung eine zentrifugale Bewegung der Kolloidteilchen im Tropfen statt. Mit dieser Feststellung nehmen wir das Prinzip unserer Nachweistechnik, bezüglich der endgültigen Sichtbarmachung des Antigen-Antikörper-Praecipitates vorweg (s.u.). Zugleich soll vermerkt sein, daß das Gelingen dieses Nachweises von folgender Grundbedingung abhängt: Die Verdunstung darf allein von der Kuppe des Tropfens her erfolgen. Eine Verdunstung vom Tropfenrand aus bewirkt, besonders bei höheren Wärmegraden, eine nabelartige, meist mittelpunktsnahe Substratansammlung und verhindert den Erfolg des Testes.

Das Zusammenfügen von Kristalloiden und Kolloiden in einer gemeinsamen wässrigen Lösung, mit dem Ziel durch Verdunstung ein Auftrocknungsbild zu erhalten, wird eigentlich mit dem Namen der Influenzstagoskopie belegt. Auch unser Serostagogramm, bei dem die Eiweißkörper als die die Kristallisationstracht des Kochsalzes influenzierenden kolloiden Bestandteile der Lösung anzusprechen sind, ist also, genau bezeichnet, ein Influenzstagogramm. Grundsätzlich muß hierbei beachtet werden, daß bei gleichbleibendem NaCl-Gehalt der Lösung durch Verminderung des Kolloidgehaltes eine gewisse Rarifizierung des Bildes eintritt, die von einer zuerst noch vorhandenen rhytmischen "Isohypsenbildung" zu einer zunehmenden Verarmung der Formation bis zur typischen Abscheidung würfelförmiger Kochsalzkristalle sowie zirkularer dickerer Kristallsäume führt. Unsere getrennte Ansetzung des menschlichen Serums und seines Antiserums belegt mit beider Auftrocknungsbild diese Regel. Das eiweißreichere Antiserum zeigt nämlich ein mar-

kantes eigenwilliges Stagogramm, während das verdünnte und damit eiweißarme menschliche Serum die geschilderte Rarifizierung sowie die Abscheidung würfelförmiger NaCl-Kristalle je nach Konzentration aufweist.

Daß wir über die Frage, ob Antigen und Antikörper bei ihrer gegenseitigen Reaktion direkt ein irgendwie charakteristisches Influenzstagogramm abgeben, zu unserer Nachweistechnik gekommen sind, hat seinen Grund in dem auffälligen Ausdrucksreichtum aller gesehenen Stagogramme. Vorweg ist in diesem Zusammenhang z.B. die absolut gleichbleibende Besonderheit des Norm-Serostagogramms des Säugetieres bzw. des Menschen zu nennen. Denn obwohl die hier sich zeigenden sog. Denariten bei Pferd und Rind gröber erscheinen als beim Menschen, und beim Kinderserum z.B. die Pfötchen besonders gebildet sind und auffallend oft starke Fließzonen zeigen, so sind diese Prägungen endgültig nur sekundärer Natur und es bleibt die Tatsache, daß alle diese Stagogramme mehr oder weniger eine Übereinstimmung bieten. Sobald man aber die Untersuchungen auf das Serum des Haushuhnes, der Gans und der Taube ausdehnt, und das der Amphibien und Fische hinzunimmt, so findet sich das Prinzipielle. Es ist dies die unverkennbare Tatsache, daß zwischen dem Norm-Serostagogramm dieser Tierklassen und dem Norm-Serostagogramm der Säugetiere ein Unterschied besteht, der insbesondere die Pfötchenbildung als kennzeichnend für "Säugetierstagogramme" ausweist. Wenn man dies und dazu die beinahe typischen Stagogramme der Sekrete und Exkrete wie Speichel, Tränen, Milch, Schweiß usw. gesehen hat, ist obige Fragestellung zu verstehen.

Die auf Grund vieler Versuche gewonnene Antwort war aber verneinend. Es liegt dies daran, daß beim Auftrocknen die influenzierte Kristalltracht übermächtig und unbeeinflußbar blieb. Verfolgt man, wie wir es stets tun, den Praecipitationsvorgang unter dem Mikroskop, so scheinen sich die flockigen Antigen-Antikörperkomplexe später mehr in der Nähe der Objektträgeroberfläche zu halten und die NaCl-Kristallformationen darüberziehend endgültig das Influenzstagogramm zu bilden.

Gerade aber die Suche nach den jedesmal im Stagogramm überdeckten und nicht gestaltend wirkenden Flockungsprodukten, ließ eine Reihe verschiedener Versuche anstellen und führte zu einer stagoskopartigen Technik.

Zuerst war das einzige Positivum der Beobachtungen, daß es zur Prüfung der Eiweißkonzentration der fraglichen Lösung zweckmäßig ist, von dieser ein Stagogramm anzufertigen; zumal sich ein solches zu der Feststellung gebrauchen läßt, ob überhaupt ein kolloidbedingtes Bild vorliegt und ob Anklänge an bekannte und charakteristische Stagogramme bestehen. Bei einer sich im Stagogramm ausdrückenden Eiweißkonzentration von ca. 1:1000, könnte sogar ohne Materialverlust Aufnahme mit Aqua dest. erfolgen; jedenfalls aber ist sonst die Einstellung auf diesen Wert mit 0,85%iger NaCl-Lösung vorzunehmen. Durch Zugabe von Antiserum wird schließlich der eigentliche Praecipitationsversuch angesetzt, wobei empirisch festgestellt wurde, daß, wenn kein zwingender Materialmangel vorliegt, der direkte Ansatz, also des nicht aufgetrockneten Antigens mit seinem Antikörper, eine stärkere Reaktion ergibt. Unter dem Mikroskop wird das übliche Geschehen zwischen Antigen und Antikörper verfolgt. Deutlich ist das Wachsen der Flokkungsprodukte zu sehen, die gegen die Mitte zu eine gewisse Verdichtung aufweisen, während die kleineren und damit leichteren Substrate mehr einem zentrifugalen Zug zu folgen scheinen. In der Endphase der Auftrocknung überzieht, wie bereits erwähnt, die Kristalltracht das Praecipitationsbild. Um diese Überdeckung zu beseitigen und wenigstens die darunter liegenden Praecipitate an die Sichtfläche zu bringen, wurde eine Schichtverdünnung der nach erfolgter Reaktion noch flüssigen Phase erwogen. Es geschah dies auch nach Art eines Blutausstriches und zeitigte ein erstes Resultat. Das Praecipitat wurde als profilierte kleine Erhebungen sichtbar. Natürlich bedeutete diese Technik zugleich eine störende flächenhafte Ausbreitung eines evtl. geringen spezifischen Niederschlages. Deshalb erschien es besser, den aufgetrockneten Antigen-Antikörpertropfen zu waschen, zumal die beobachtete Haftfähigkeit

des Praecipitates dies ohne Verlust möglich erscheinen ließ. Tatsächlich wurde die deckende Kristallbildung, nicht praecipitiertes Eiweiß und der Zufallsniederschlag, da nicht oder weniger haftend, größten Teils weggewaschen und es blieb nach Auftrocknen das eigentliche Praecipitationsbild zurück. Leider war nicht zu verhindern, daß es beim Eintauchen und Waschen zwar nicht zur Ablösung der Plaques kam, aber nicht in die Reaktion einbezogenes Resteiweiß verwischend wirkte. Aufsprühen von Flüssigkeit oder Aufdampfen, z.B. in der feuchten Kammer, brachten ebenfalls nicht den erhofften Erfolg, da kein ausreichendes Freiwaschen des Praecipitationsbildes zustande kam. Ein brauchbares Ergebnis brachte erst unser Grundversuch:

Als Reaktionsunterlage dienten vollkommen plane Normalobjektträger, die einer vorbereitenden gründlichen Säuberung in dieser Weise unterzogen wurden:

1.) Waschen unter fließendem Leitungswasser und nachspülen mit destilliertem Wasser,
2.) einlegen in 3%igen Salzsäurealkohol,
3.) Wiederholung der Prozedur 1,
4.) trocknen im Wärmeschrank,
5.) staubdichte Aufbewahrung
6.) unmittelbar vor der Benutzung abblasen der Oberfläche des verwendeten Objektträgers mittels eines Gebläses, z.B. Gummiballons, und dreimaliges durchziehen durch die Bunsenflamme mit folgender Abkühlung auf sauberer Planfläche.

Es ist noch zu sagen, daß die reinen Objektträger niemals mit der Hand bzw. den Fingern, sondern nur mit der Pinzette angefaßt werden dürfen. Das zum Ansatz gekommene Antiserum war praecipitierendes Serum der Behringwerke mit dem spezifischen Titer 1:10.000 - Antimensch. Die Lösung dieses Trockenantiserums erfolgte, gemäß Vorschrift, in 0,5 ml sterilem destilliertem Wasser. Das menschliche Serum kam in einer Verdünnung von 1:1000, 1:5000 und 1:10.000 zur Verwendung. Diese Verdünnungsreihe wurde durch Zugabe von 0,85%iger Kochsalzlösung zu dem ursprünglichen Serum erreicht und mit dem Antiserum im Verhältnis 2:1 angesetzt. Von diesen Verdünnungen wurde zur

Kontrolle ein Stagogramm (s.o.) angefertigt. Zum Ansatz fand für Serum und Antiserum je eine Pipette Verwendung, wie sie dem Antiserum der Behringwerke beigegeben ist. Es wurden also damit auf den Objektträger zwei Tropfen Serum und ein Tropfen Antiserum gegeben. Die Ersttropfen (Serum) wurden durchgerührt und gegen die Peripherie zu mäßig ausgebreitet. Die Ausbreitung sichert nämlich nach Vereinigung mit dem Antiserum und Auftrocknen durch einen peripherer liegenden Randwall, den Platz für einen größeren späteren Dritt-Tropfen und damit ein größeres "Kolloidfenster" (s.u.). Nach Zugabe des Zweittropfens (Antiserum) kam das Präparat sofort unter das Mikroskop und wurde bei mittlerer Vergrößerung betrachtet. Nach einigen Minuten sah man eine feine Körnelung, die anfangs eine aufsteigende Tendenz zu haben schien. Allmählich erfolgte - deutlich bei dem Verdünnungsgrad 1:1000 - eine teilweise Verdichtung zu sich absenkenden vorzüglich girlandenförmigen Gebilden, die am besten zu erkennen waren, wenn man nicht direkt darauf, sondern gleichsam der Peripherie des Tropfens zu vorbeisah. Zu diesem Zeitpunkt, nach Ablauf von 10-15 Minuten wurde die mikroskopische Beobachtung abgebrochen, der Reaktionstropfen im Wärmeschrank bis zum absoluten Auftrocknen einer Temperatur von 40°C ausgesetzt und anschließend erneut zur Überprüfung der Stagogrammbildung unter das Mikroskop gebracht. Vor uns lag der beim Ansatz mäßig ausgebreitete und nun als Stagogramm aufgetrocknete Reaktionstropfen. Er zeigte von außen nach innen: konzentrische Ringe, Randwall, spießförmige und im Innenfeld schollen- bzw. muschelartige Bildungen. Diesem inneren Bezirk galt nun unser besonderes Interesse. Denn jetzt setzten wir als Dritt-Tropfen vorsichtig Aqua dest. so in die Stagogrammitte, daß dessen flüssiger Rand das schollige Innenfeld nicht überschritt. Der Kolloidtropfen, und ein solcher wird durch Herauslösung und Aufnahme von Eiweiß der Aqua dest.-Tropfen, nimmt in seinem Umfang, auch durch Fließen, nach dem Setzen gern zu, sodaß eher ein kleinerer Tropfen zu empfehlen ist. Zur Auswirkung kam jetzt die festgestellte deutliche Haftfähigkeit des Praecipitates

sowie die zentrifugale Bewegung von Kolloidteilchen im auftrocknenden Tropfen. Von letzterer kann man sich übrigens durch Augenschein überzeugen, indem man einen Tropfen Elektrokollargol, dessen Teilchen bei stärkerer Vergrößerung im Mikroskop noch sichtbar sind, während des Auftrocknens zum Stagogramm beobachtet. Im Ablauf und Ergebnis des Grundversuches erlebten wir dann tatsächlich die Bestätigung aller vorausgegangenen Beobachtungen: Während das Praecipitat auf seiner Objektträgerunterlage unverändert liegen blieb, mußte im Zuge der einsetzenden Verdunstung des Kolloidtropfens im Brutschcank bei 4o° C, erneut eine zentrifugale Wanderung der Teilchen aus gelöstem ungebundenen Eiweiß erfolgt sein, dem das NaCl nachzog. Es hatte sich nämlich, das früher verdeckende Material verbrauchend, ein zweiter Wall gebildet und zum Aufklaren des Mittelfeldes geführt. Nochmal soll unterstrichen sein, daß es falsch ist, den Aqua dest.-Tropfen über die Innenfehgrenze des Stagogramms laufen zu lassen, weil dann durch Überangebot an Kolloid der Aufbau eines zweiten Walles das sonst das Praecipitat überdeckende aber dünnschichtige Substrat nicht menr verbrauchen kann. Den normalen Ablauf des Testes zu unterstützen, saugten wir bei früheren Versuchen nach 5 minütiger Erwärmung die im nun sich bildenden zweiten Randwall angereicherten Substratteilchen mittels eines im Verhältnis zum Tropfen etwas größer gelochten Filterpapieres ab, indem wir weiter Aqua dest. tropfenweise darauf setzten und so den Kontakt zum Lochrand des übergelegten Filterpapieres erzwangen. Bei der jetzigen ausschließlich von oben herab erfolgenden Wärmezuführung, die eine Verdunstung von der Kuppe des jeweiligen Tropfens und nicht von dessen Rand her zur Folge hat, erwies sich diese Maßnahme als überflüssig. Ohne jegliche äußere Einflußnahme öffnete sich deshalb im Mittelfeld des Antigen-Antikörper-Stagogramms das unsere Technik charakterisierende "Kolloidfenster" für den Blick auf das qualitativ und quantitativ bewertbare, lagegerechte und gut profilierte spezifische Praecipitat.

IV. Diskussion.

Zum Nachweis der tatsächlichen Reaktion eines Antigens mit seinem Antikörper wurden verschiedene ausgewählte Methoden beschrieben, denen wir eine eigene angliedern konnten. Für eine wertende Besprechung ist es wohl am zweckmäßigsten, Vergleichsmerkmale heranzuziehen.

So kann es sich um einen indirekten Nachweis handeln, wobei dann eine Makroreaktion vorliegt und die Bindung des Antikörpers mit seinem homologen Antigen als in der Hauptsache biochemische bzw. biophysikalische Folge, nämlich als Flockung nachgewiesen wird. Andererseits kann eine Methode vorliegen, die über den Bereich der eben erwähnten Makroreaktionen hinaus bis in den mikroskopischen Bereich vorzudringen gestattet, wobei es zu einer direkten Bindung der Reaktionspartner kommt. Eine kennzeichnende Unterscheidung ergibt sich weiter dadurch, daß man das Ergebnis der Reaktion dahingehend kritisch betrachtet, ob die einzelne Methodik nur ein qualitatives und kein quantitatives Arbeiten, oder ein solches, das beides umfaßt, ermöglicht. Von gleicher Bedeutung ist eine Gegenüberstellung bezüglich des Sicherheitsgrades der Ergebnisse sowie der Feststellung des für solche Resultate nötigen Zeit- und Geräteaufwandes. Damit in Zusammenhang stehend gilt es, die Eignung des einzelnen Verfahrens zur Routinemethode zu prüfen, wobei dann noch die für die tägliche Praxis und ihre Forderungen erwünschte Dokumentierbarkeit der Untersuchungsergebnisse von nicht unwesentlichem Belang ist. Nach diesen Merkmalen sollen nun die angeführten Methoden nochmals besprochen und gewertet werden.

Bei der HAUSER'schen Kapillarmethode handelt es sich, genau wie bei der UHLENHUTH'schen Röhrchenprüfung, auf der erstere basiert, um eine Makroreaktion, wobei die Bindung des Antigen und Antikörpers in der Flockung ihren Ausdruck findet. Beide Methoden gestatten allein ein qualitatives Arbeiten, wobei die Kapillarmethode, da sie minutiös ist und keine Wiederholung gestattet, absichernde Bedingungen erfüllen muß. So gilt der Eintritt der Reaktion nur dann als gegeben, wenn

sich innerhalb von ca. 15 Minuten ein deutlicher Ring an der Berührungszone zeigt und in der Folge alle Phasen der spezifischen Fällung dargeboten werden. Von einem quantitativen Arbeiten kann hier, wenn man einen exakten Maßstab anlegt, nicht die Rede sein. Was den Grad der Zuverlässigkeit des Ergebnisses anlangt, so ist dieser bei Beachten oben angeführter Kautelen schwer zu übertreffen. Dieser Vorzug sowie der überhaupt nicht ins Gewicht fallende Zeit- und Geräteaufwand, haben die an sich klassische Reaktion zur Routinemethode prädestiniert. Eine Dokumentierung des Untersuchungsergebnisses ist bei der UHLENHUTH'schen wie HAUSER'schen Methodik natürlich nicht möglich.

Wenn wir nun, gemäß den vorausgeschickten Dispositionspunkten, die OUDIN-OUCHTERLONY'sche Agargeldiffusion kritisch betrachten, so handelt es sich bei ihr ebenfalls um einen indirekten Nachweis in Form der Praecipitation. Während es sich bei der Immundiffusion nach OUDIN, die der OUCHTERLONY'schen wegweisend vorausging, um eine sogenannte eindimensionale Anordnung handelte, ist letztere eine zweidimensionale. Beiden ist aber gemeinsam, daß die Immunpraecipitation im Agargel, also nicht in freier Lösung, sondern in den Maschen dieses Gels stattfindet, in denen auch das entstehende Praecipitat endgültig festgehalten wird. Die Wirkung der Schwerkraft, die bei den vorbeschriebenen Reaktionen Bedeutung hatte, ist damit ausgeschaltet und man kann diesen Unterschied vergleichsweise mit dem Schritt von der freien Elektrophorese zur Elektrophorese auf Trägermedien in Beziehung setzen. Damit ist dargelegt, daß die Reaktion als Makrogeschehen im Gel vor sich geht und also vorzüglich ein qualitatives, aber wiederum nur bedingt quantitatives Arbeiten ermöglicht. Jedoch soll die zusätzliche Möglichkeit einer Differenzierung mittels der Immunelektrophorese nicht unerwähnt bleiben. Ein begrenzter quantitativer Nachweis ließe sich evtl. durch Rückschlüsse aus der Stärke oder Dichte des linienartig ausgefallenen Praecipitates, bzw. aus der Anzahl der Fraktionen ziehen. Hinsichtlich der Erfassung quantitativer Werte wird man also,

trotz allem, nur von Anhaltspunkten sprechen können. Diese Immunodiffusionsmethode beeindruckt aber jeden, wegen ihrer Eindeutigkeit und Leistungsfähigkeit. Gegenüber den vorgenannten Verfahren überwindet sie nämlich eine bei diesen bestehende gewisse Schwierigkeit der Ablesung, wobei sie noch den entscheidenden Vorteil aufweist, daß nunmehr auch mit stark verunreinigten, also keineswegs, wie sonst immer, mit nur klaren Untersuchungsflüssigkeiten gearbeitet werden kann. Wesentlich zur Sicherheit der Reaktion trägt auch die Möglichkeit bei, das Untersuchungsmaterial auf derselben Agarplatte gleichzeitig und somit unter völlig gleichen Bedingungen gegen verschiedene praecipitierende Seren auszutesten. Eine wenn auch zeitlich begrenzte Fixierung der Untersuchungsergebnisse zum Zweck der Dokumentation ist ebenfalls gegeben. Was Zeit und gerätemäßigen Aufwand anlangt, kann von einer relativen Geringfügigkeit gesprochen werden, welches Urteil man auch auf die zu fordernde technische Geschicklichkeit des Untersuchers ausdehnen darf. Wegen all dieser Vorzüge hat sich das Agardiffusionsverfahren berechtigterweise einen ersten Platz als Routinemethode gesichert.

Eine verschiedene Bewertung erfuhr im Laufe der Zeit die Beobachtung der Antigen-Antikörper-Praecipitation unter dem Mikroskop, vorzüglich im hängenden Tropfen. Immer wieder wurde, so auch in einer Abhandlung von O.LEERS der Vorbehalt gemacht, zu dieser Untersuchungsweise nur ganz Geübten zu raten. Es geschah dies aus der Sorge heraus, daß mangelnde Klarheit oder gar Unreinheit der Lösungen zu einer falschen Diagnose führen könnten. Eine entschieden andere und positive Stellung nimmt eine Großzahl von Forschern ein, an deren Spitze als frühzeitigster Befürworter ROBIN steht. Auch hierbei handelt es sich um einen indirekten Nachweis, der sich von einem feinkörnigen Niederschlag bis zu einer von der Reaktionsstärke abhängigen Flockung steigert. Da wir im Zuge unserer eigenen Technik die Beobachtung des Reaktionsgeschehens unter dem Mikroskop regelmäßig üben, können wir uns selbst hierzu folgendermaßen äußern: Bei einer zur Beobachtung kommenden normal

starken Reaktion dürfte zwar, wegen ihres deutlichen, vorzugsweise girlandenförmigen Flockungsbildes, eine Fehldiagnose weniger zu erwarten sein; es steigert sich aber die gegenteilige Möglichkeit bei einer geringen und damit im Formbild unspezifischen Reaktion. Gleichwohl ist die gebotene schnelle Übersicht hervorzuheben. Jedoch kann auch hier, wie bei den vorher besprochenen Verfahren, von einem quantitativen Arbeiten nur bedingt die Rede sein. Während also Zeit-und Geräteaufwand gering bleiben, ist bei der alleinigen Beobachtung der Antigen-Antikörper-Reaktion, gleichsam in statu nascendi, zur Sicherung der Diagnose Vorsicht geboten und es sind besonders strenge Kontrollproben zu fordern. Abschließend ist noch zu bemerken, daß sich diese Methodik auch nicht zur Dokumentierung und also insgesamt nur bedingt für die Belange der Praxis eignet.

Den wesentlichsten Fortschritt brachte eigentlich bisher die Abkehr von den Makroreaktionen durch den direkten Bindungsnachweis von Antigen und Antikörper mittels der Fluoreszenzimmunologie. Welche weitreichende Bedeutung diesem direkten Nachweis zukommt, mögen ein paar Beispiele aus der Fülle seiner speziellen Anwendungen bezeugen. Man erfährt z.B. durch ihn, ob in einer Bakteriensuspension, einer Aufschwemmung tierischer Zellen oder einem histologischen Schnitt sich das gesuchte Antigen befindet und wo es zu lokalisieren ist. Die Immunologie erkennt also auch wo bestimmte Antigene wie artfremdes Eiweiß oder Bakterienpolysacheride, die man einem Versuchstier einspritzte, in dessen Körper verankert werden, welche Zellen der beteiligten Organe das Antigen enthalten, wo in ihnen es abgelagert wird und wielange es dort verbleibt. Gleichermaßen wird das Vorkommen und damit der Bindungs- oder Bildungsort eines Antikörpers aufgezeigt und wir erfahren dabei, in welchen Zellen bei einer Immunisierung der Antikörper gebildet wird. Auf all diese wissenschaftlichen Fragen und Probleme, die sonst nie oder zumindest nur kompliziert angegangen werden konnten, vermag die Fluoreszenzimmunologie aufschlußreich zu antworten. Selbst quantitative Auskünfte wie über die Zusammensetzung natürlicher Keimfloren kann man er-

halten. Es sei aber auch nicht verhehlt, daß die Methodik, trotz ihrer faszinierenden Eigenschaften immer noch am Beginn der Entwicklung steht. Über Fragen der Fluoreszenzimmunologie referierte MAYERSBACH auf einem Symposion der Arbeitsgemeinschaft für Histochemie 1956 in Mainz. Er verwies dabei auf die noch ungelösten Schwierigkeiten, besonders hinsichtlich der Spezifität der erzielten Untersuchungsergebnisse. Auch heute wird immer wieder unterstrichen, daß schon die Beschaffung eines einwandfreien Fluoreszeinantikörperkonjugates mit der hierzu nötigen Gewinnung eines Serums von hohem Antikörpertiter, sowie die Reinigung dieses spezifischen Farbstoffes, nur schwer zu bewältigende Aufgaben darstellen. Eine Dokumentation ist, wenn auch bei der starken Bedrohung der Präparate durch Farbabblassung zeitlich begrenzt, unter Verwendung bewährter Einbettungsverfahren ohne weiteres möglich. Obwohl also die Anwendung des fluoreszenzmikroskopischen Verfahrens für viele Fragen von größtem Wert ist und sicher dazu dient, weitere wichtige Aufschlüsse in Zukunft geben zu können, bleibt die Methode diffizil und ist damit für eine Routinemethode vorerst noch nicht geeignet.

Was die eigenen Untersuchungen anlangt, so sei hervorgehoben, daß die im Rahmen der Studie ausgewählten und beschriebenen Methoden als Vorbild dienten. So war für die erwünschte Einfachheit des Testes, auch bezüglich Material- und Zeitaufwand die klassische UHLENHUTH'sche bzw. HAUSER'sche Methode richtungweisend. Von den zahlreichen Vorzügen der OUCHTERLONY'schen Agargeldiffusion wurde eine möglichst gleichwertige Eindeutigkeit und Dokumentierbarkeit des Befundbildes angestrebt. Die aktuelle mikroskopische Beobachtung der Antigen-Antikörper-Praecipitation findet sich in unserer Methodik ebenso, wie eine gewisse qualitative und quantitative Auswertbarkeit des Befundes, welche das fluoreszenzimmunologische Direktverfahren allerdings unerreichbar bieten konnte. Schließlich wurden alle Erkenntnisse der Stagoskopie genutzt; denn wenn auch abgewandelt, sind deren Gesetze Grundlage unserer Untersuchungen.

V. Zusammenfassung.

In vorliegender Studie wurde Wesen und Begriff von Antigen und Antikörper erläutert und anhand ausgewählter Methoden der Nachweis ihrer gemeinsamen Reaktion geführt. Als jeweilige Vorzüge dieser in Forschung und Praxis bekannten Verfahren erwiesen sich bei der HAUSER'schen Kapillarmethode die Einfachheit und Zuverlässigkeit, bei der OUCHTERLONY'schen Agargeldiffusion die Eindeutigkeit und Dokumentierbarkeit, bei der Beobachtung des Praecipitationsvorganges unter dem Mikroskop die Schnelligkeit und Aktualität und bei der Fluoreszenztechnik die quantitative und qualitative Auswertbarkeit.

Abschliebend wurde als eigener Beitrag ein stagoskopartiger Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion beschrieben, welcher im wesentlichen auf den Bildungsgesetzen des Stagogramms beruht und wobei das sinnfällige Aufklaren der Stagogrammitte gleichsam das "Kolloidfenster" für die Betrachtung und Bewertung des spezifischen Praecipitates bildet. Vermerkt sei noch, daß die Vorproben zum eigentlichen Test stets nach der reinen stagoskopischen Methodik SOLÉ's ablaufen sollen. Der stagoskopartige Nachweis der spezifischen Praecipitation muß aber, zwecks Ausschaltung jeglicher heterologen Reaktion, unter Anwendung der den Gesamtablauf beschleunigenden Brutschrankwärme vor sich gehen.

Literaturverzeichnis.

BORDET, J., Le mécanisme de l'agglutination. Ann.Inst.Pasteur Paris 1899, 225.

BOYD, W., Fundamentals of Immunology, 232, New York 1943.

COONS, A.H. and M.H.KAPLAN, Localization of Antigen in Tissue Cells, II Improvement in a Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody, J.Exp.Med.91, 1, (1950).

DOERR, R., Die Immunitätsforschung, Bd.1, Antikörper, Springer-Verlag Wien 1947.

DOLD, H., Darstellung von Flüssigkeitsstrukturen (Liquidoskopie) und spez. von Serumstrukturen (Seroskopie) durch das Trockentropfverfahren, Ärztl.Forsch.4.Jg., H.12, 336 (1950)

DUNGERN, von, E., Die Antikörper, Jena 1903.

FISKE-NOYES, W., Die Sichtbarmachung des ägyptischen Virus lol im Mäusehirn, in Kulturen menschlicher Carcinomzellen mit Hilfe fluoreszierender Antikörper, J.Exper.Med.102, 243 (1950).

FISKE-NOYES, W., u. R.C.MELLORS, Fluorescent antibody dedection of the antigens of the shope papillome virus in papillomes of the wild and domestic rabbit. J.Exper.Med.(N.Y.) 106, 555 (1957).

GITTLIN, D., B.H.LANDING and A.WHIPPLE, The localization of homologues plasma proteins in the tissue of young human beeings as demonstrated with fluorescent antibodies. J.Exper.Med. 97, 163 (1953)

GOLDMAN, M., Cytochemische Differenzierung der Endammoeba histolytica und Endamoeba coli mittels fluoreszierender Antikörper. Amer.J.Hyg. 58, 319 (1953).

HAITINGER, M., Fluoreszenzmikroskopie, Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.G., Leipzig, 1959.

HAUROWITZ, F., Chemie der Antigene und Antikörper, in Kallos, Fortschr.d.Allergielehre, (1939).

HENNING, N., u. A.BECK, Liquordiagnostik am Eintrocknungsbild, Klin.Wschr. 13.Jg., Nr.7, 251 (1934).

LANDSTEINER, K., Die Spezifität der serologischen Reaktionen, Berlin 1933.

LEERS, O., Die forensische Blutuntersuchung, Julius-Springer-Verlag, Berlin 1910.

MARESCH, W. u. E.WEHRSCHÜTZ, Moderne Methoden der Blutfleckendiagnostik, Archiv f. Kriminologie 132, H.1 u.2, 1963.

MAYERSBACH, von, H., Immunhistologische Methoden im Rahmen der Eiweißhistochemie, Acta Histochem. 3, 256 (1957).

MAYERSBACH, von, H., Immunhistologische Methoden I.Prinzip, Ergebnisse und kritische Betrachtungen zur Technik, Acta Histochem. 4, 260 (1957).

OUCHTERLONY, Oe., Diffusion-in-gel-methods for immunologial analyses, Progr.Allergy, vol.5, pp 1-78 (Karger, Basel/ New York 1958).

POETSCHKE, G., H. UEHLEKE u. L. KOLLISCH, Untersuchungen mit fluoreszierenden Antikörpern I. Allgemeines und Methodisches, Z.Immunitätsf.u.exper.Therapie 114, 393 (1957).

SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ u. H. WARNATZ, Vergleichende Analysen von Präzipitaten, Clinica Chimica Acta, Vol.3, 535(1958).

SOLE, A., Stagoskopie, Verlag Franz Deuticke, Wien 1960

TOPLEY, W.W.C., and G.S.WILSON, The Principles of Bacteriology and Immunity, 2.Edit., London 1936.

UEHLEKE, H., Neue Möglichkeiten zur Herstellung fluoreszenzmarkierter Proteine, Z.Naturforschung 13, 722 (1958).

UEHLEKE, H., Markierung von Proteinen mit fluoreszierenden Farbstoffen, Die Naturwissenschaften, 45, 87 (1958).

UHLENHUTH, P., Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschenblut und Tierblut, G.Fischer-Verlag, Jena 1905.

Es sei mir hiermit gestattet, Herrn Prof.Dr.med. et Dr.phil. E. Weinig, dem Vorstand des Instituts für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg, für alle Anregungen sowie die vielseitige Unterstützung meinen herzlichsten Dank zu sagen.

Lebenslauf.

Am 27.1o.19o9 wurde ich als Sohn des Intendantur-Aspiranten Johann Ott und seiner Ehefrau Babette Ott, geb. Bub, zu Würzburg geboren. Nach Besuch der Grundschule in Nürnberg trat ich 192o in das dortige Neue Humanistische Gymnasium über. Nach Absolvierung desselben studierte ich Musik und Gesang und sollte mein Erstengagement in Nordhausen antreten. Diese Laufbahn wurde durch Ausbruch des Krieges beendet. Nach Einberufung und Einsatz wurde mein Geburtsjahrgang im Jahre 194o freigestellt, und ich konnte deshalb meiner Neigung folgend mit dem Medizinstudium beginnen. Nach erneuter Einberufung wurde ich nach weiterer Frontbewährung zwischenzeitlich zum Studium abgestellt und nach Beförderung zum Fahnenjunker 1944 in die Studentenkompanie eingereiht. Nach Kriegsschluß 1945 führte ich vertretungsweise einen Betrieb und kehrte nach Konsolidierung meiner wirtschaftlichen Verhältnisse zum Studium zurück. Am 13. August 1959 bestand ich das medizinische Staatsexamen und leistete anschließend meine Pflichtassistentenzeit am Städt. Krankenhaus in Schwabach, dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik und der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen ab. Vom 1.1o.196o an war ich als Assistent an der Universitäts-Augenklinik Erlangen tätig und verließ dieselbe nach abgeschlossener Facharztausbildung am 31.12.1963. Ich beabsichtige mich nun in eigener Facharztpraxis in Schwabach niederzulassen.

Fotodruck

– Wiltrud Hogl, Erlangen Brüxer Straße 9, Telefon 16 36 –